过表达亚甲基四氢叶酸脱氢酶对高山被孢霉脂质合成的影响

汪企再，王鸿超*，陈海琴，赵建新，张灏，陈卫，陈永泉

江南大学食品学院，江苏 无锡，214122

摘 要 高山被孢霉是一种富含多不饱和脂肪酸的丝状真菌,但其脂质过程中 NADPH 的来源还没有研究透彻。本文以高山被孢霉（尿嘧啶营养缺陷型）作为出发菌株，研究了亚甲基四氢叶酸脱氢酶（MTHFD1）对高山被孢霉脂质合成的影响。首先构建了过表达载体 pBIG2-ura5s-*MTHFD1*，采用根癌土壤杆菌介导转化真菌的方法，将二元表达载体转化进高山被孢霉 CCFM501 中，在筛选培养基 SC-CS 平板上进行筛选，进而得到稳定遗传 *MTHFD1* 基因的过表达菌株（*MA-MTHFD1*）；其次提取 *MA-MTHFD1* 菌株基因组进行 PCR 鉴定，并结合 qPCR 分析结果，表明 *MTHFD1* 基因成功在高山被孢霉中实现了过量表达；最后通过对 *MA-MTHFD1* 中的脂肪酸含量，NADPH 含量及 NADPH 合成途径中相关基因转录水平进行分析，研究 *MTHFD1* 基因过表达对脂质合成的影响。实验结果表明，过表达 *MTHFD1* 基因可以提高高山被孢霉脂质合成能力。与原养型高山被孢霉相比，*MA-MTHFD1* 菌株中脂肪酸含量提高了 40.13%，NADPH 的含量提高了 26.45%，而且 NADPH 合成途径中其他相关基因苹果酸酶（ME）和异柠檬酸脱氢酶（IDH）的转录水平也发生了上调。这一系列研究结果表明在高山被孢霉脂质合成还原力形成中，*MTHFD1* 基因起到了关键作用。本文为解析高山被孢霉中 NADPH 来源及深入研究脂质合成机理，从而对其胞内脂肪酸代谢通路进行分子水平上的改建提供了一定的理论依据。

关键词： 亚甲基四氢叶酸脱氢酶，高山被孢霉，脂质合成，NADPH

Effects of MTHFD1 overexpression on lipid synthesis in the oleaginous fungus, *Mortierella alpina*

WANG Qi-zai, WANG Hong-chao*, CHEN Hai-qin, Zhao Jian-xin, ZHANG Hao, CHEN Wei, CHEN Yong-quan

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122 P. R China

Abstract: *Mortierella alpina* is a filamentous fungus with a high polyunsaturated fatty acids content, but its sources of NADPH needed for lipid synthesis are not been studied completely. The binary vector pBIG2-ura5s-*MTHFD1* was constructed for the transformation of the methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (*MTHFD1*) into the M. alpina (uracil auxotrophic) strain by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT). PCR analysis identified the presence of the *MTHFD1* overexpression cassette in the genome, and qPCR analysis showed that the transcript levels of the *MTHFD1* gene in *MTHFD1* overexpression strain (*MA-MTHFD1*) were significantly increased compared to controls. The results showed that *MTHFD1* overexpression influenced lipid synthesis significantly. In comparsion to

[1]基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目 (31400038)
作者简介：汪企再，女，硕士研究生，研究方向：食品生物技术
*通讯作者:王鸿超，E-mail：hcwang@jiangnan.edu.cn

prototrophic *Mortierella alpina*, the total fatty acid(TFA) level increased by about 40.13% and NADPH level simultaneously increased by 26.45% in *MA-MTHFD1*. Moreover, two key enzymes ME and IDH in NADPH synthesis were up-regulated. Based on the results, *MTHFD1* plays an important role in NADPH generation during lipid synthesis in *M. alpina*. This study lays a foundation for uncovering mechanism of lipogenesis in *M. alpina*.

Key words:MTHFD1; *Mortierella alpina*; lipid synthesis; NADPH

高山被孢霉（*Mortierella alpina*）是一种可以高产油脂的丝状真菌,可用来生产多种多不饱和脂肪酸(PUFAs)[1,2]。PUFAs 具有重要的生理功能，属于人体必需脂肪酸，可以用来预防和治疗各种慢性疾病[3,4]。现阶段研究人员主要就优化培养基、选育菌种以及验证脂质合成途径中相关酶的功能方面展开研究[5,6]，但在脂质合成机理方面的研究还不够深入。

NADPH 是脂质合成的还原力来源[7]。研究表明，在高山被孢霉中，6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGD）、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）、苹果酸酶(ME)可为脂质合成提供所需 NADPH [8-10]。本实验室对高山被孢霉全基因组进行测序分析后发现高山被孢霉中存在完整的叶酸代谢途径[11]。在叶酸代谢途径中，5,10-亚甲基四氢叶酸在亚甲基四氢叶酸脱氢酶（MTHFD1）的作用下氧化成 5,10-甲炔基四氢叶酸，此过程中伴随着 NADPH 的生成（图 1）[12-14]。此外，王鸿超 [15] 等人通过对 OP9 小鼠骨髓基质细胞添加叶酸代谢抑制剂甲氨喋呤（MTX）和甲氨苄啶（TMP）后，发现 OP9 细胞在这两种试剂的作用下分化为脂肪细胞的能力下降。因此我们推断，在高山被孢霉叶酸代谢途径中, MTHFD1 也能生成一定量的 NADPH，从而在脂质合成中发挥重要作用。本研究通过在高山被孢霉中过表达 *MTHFD1* 基因，可进一步解析其在脂质合成中的作用，从而为对脂肪酸代谢通路进行分子水平上的改造提供一定的理论依据。

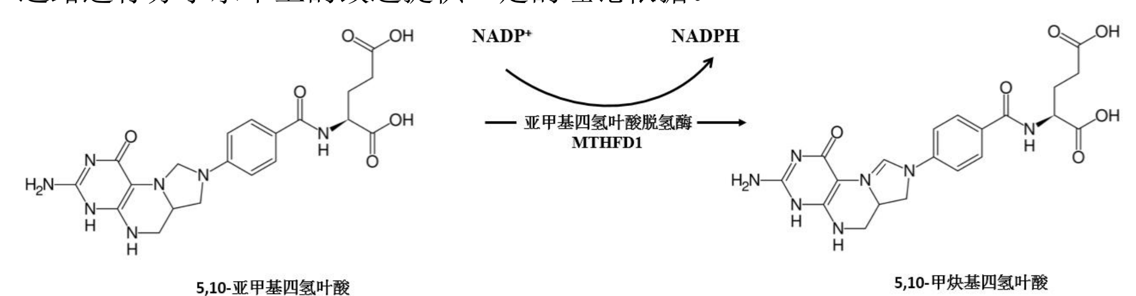


图 1 高山被孢霉中亚甲基四氢叶酸脱氢酶反应

Fig.1 The reaction of MTHFD1 in *M.alpina*

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

高山被孢霉 ATCC 32222（购于美国标准生物品收藏中心），其营养缺陷型菌株 CCFM 501、大肠杆菌 *E. coli* DH5α、遗传操作载体 pBIG2-ura5s-ITs 和根癌农杆菌 CCFM 834 均来自本实验室研究中心菌种保藏库；Trizol (Invitrogen,美国); PrimeScript RT reagent kit（TaKaRa，日本）; Taq DNA 聚合酶（康为世纪，中国）; KOD plus 高保真 DNA 聚合酶（TOYOBO，日本）; 限制性内切酶（NEB，美国）; T4 DNA 连接酶（Promega，美国）; iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad，

美国)；PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒（Fermentas，美国）；提取基因组 DNA 试剂盒 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit（BioFlux）；其他试剂均为分析纯。

培养基见表 1。

表 1 本文所用培养基

Table 1 Culture mediums used in this study

培养基	配方(1L)
LB 液体培养基	10 g 胰蛋白胨，10 g 氯化钠，5 g 酵母粉。（在该培养基配方上添加 20 g 琼脂即为固体培养基）
SOC 复苏培养基	20 g 胰蛋白胨，5 g 酵母粉，0.5 g 氯化钠，3.6 g 葡萄糖，0.95 g 氯化镁，0.186 g 氯化钾
YEP 液体培养基	10 g 酵母提取物，10 g 胰蛋白胨，5 g 氯化钠。在该培养基配方上添加 20 g 琼脂即为固体培养基
MM 液体培养基	1.74 g 磷酸氢二钾，1.37 g 磷酸二氢钾，0.078 g 氯化钙，0.0025 g 七水合硫酸亚铁，0.146 g 氯化钠，0.49 g 七水合硫酸镁，0.53 g 硫酸铵，7.8 g 2-(N-吗啡啉)乙磺酸，1.8 g 葡萄糖，5 g 丙三醇，pH 值为 6.8
IM 液体培养基	在 MM 液体培养基的配方上添加 0.0392 g 的乙酰丁香酮（AS）即可
SC 固体培养基	20 g 葡萄糖，5 g 酵母氮源无氨基酸和硫酸铵，1.7 g 硫酸铵，60 mg 异亮氨酸，60 mg 苯丙氨酸，60 mg 亮氨酸，50 mg 苏氨酸，40 mg 赖氨酸，30 mg 酪氨酸，20 mg 精氨酸，20 mg 腺嘌呤，20 mg 组氨酸，10 mg 甲硫氨酸，20 g 琼脂，pH 值为 6.8
SC-CS 固体培养基	在 SC 固体培养基的配方上添加 0.1 g 壮观霉素奇霉素（spectinomycin)和 0.1 g 头孢噻肟抗生素(cefotaximeSodium)
Broth 液体培养基	20 g 葡萄糖，5 g 酵母提取物，1 g 磷酸氢二钾，0.25 g 七水硫酸镁，10 g 硝酸钾，pH 值为 6.0
GY 固体培养基	20 g 葡萄糖，10 g 酵母提取物，2 g 硝酸钾，1 g 磷酸二氢钠，3 g 七水硫酸镁，20 g 琼脂，pH 值为 6.8
GY-U 培养基	在 GY 固体培养基的配方上添加 0.1 g 尿嘧啶

1.2 仪器与设备

PCR 仪（ABI 9700，美国）；GC 2000 气相色谱仪和紫外分光光度计 UV-2450（Shimadzu，日本）；QSC-12T 型氮吹仪（泉岛，上海）；凝胶成像分析系统（UVP CDS-8000，美国）；微量紫外分光光度计（NanoDrop ND-1000，美国）；电转化仪（Eppendorf，德国）；真空冷冻干燥机（LABCONCO，美国）；荧光定量 PCR 仪（Bio-rad，美国）。

1.3 实验方法

1.3.1 高山被孢霉的培养

高山被孢霉在 Broth 发酵培养基中摇床培养 7 天后，收集菌体。取出部分菌体真空冷冻干燥后，测量干重和检测脂肪酸含量及组成成分，将剩余菌体保存在-80℃中，用于后续提取 RNA、分析基因转录水平、分析 NADPH 含量和脂肪酸

含量[16]。

1.3.2 二元表达载体的构建

首先使用 Trizol (Invitrogen)提取高山被孢霉总 RNA，然后使用 PrimeScript RT reagent kit (Takara)试剂盒对总 RNA 进行反转录，得到 cDNA 模板。根据高山被孢霉 ATCC32222 *MTHFD1* 基因的序列信息，设计 *MTHFD1* 基因引物（表 2），酶切位点 *KpnI* 和 *SacI* 用下划线标出，以高山被孢霉 cDNA 为模板，用 KOD plus 高保真聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应条件是：95℃变性 30s，55℃退火 30 s，68℃延伸 1.5 min，共计 30 个循环，68℃ 5min；

使用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物和酶切产物进行纯化，用 T4 连接酶将所得基因片段与载体 pBIG2-ura5s-ITs 于 4℃下进行连接反应，之后通过电转仪电转化导入大肠杆菌 *E. coli* DH5α中。对转化子进行 PCR 鉴定，从而筛选出阳性转化子，提取质粒，经测序验证成功后，获得二元表达载体 pBIG2-ura5s-*MTHFD1*。上述 PCR 验证及测序所需引物均为 HisproF1 和 TrpCR1，如表 2 所示。再通过电转化法将二元表达载体 pBIG2-ura5s-*MTHFD1* 导入根癌农杆菌 CCFM 834 中。

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

基因	引物序列
MTHFD1-F	CGGGGTACCGCATGCCTGTGGCATATCAGAG
MTHFD1-R	CGAGCTCTTACATGATCTTGGTCATCGC
HisproF1	CACACACAAACCTCTCTCCCACT
TrpCR1	CAAATGAACGTATCTTATCGAGATCC
MTHFD1 (qPCR)	CGGCTACGCAAGGACAT
MTHFD1 (qPCR)	GCCACCATCGGGTTATTC
6PGD(qPCR)	AAGTTGCCTGTCCGCCATC
6PGD (qPCR)	TAGTGCCAGCCGTTCTCCTT
G6PD(qPCR)	CGTATGCTGGGTCTGGTTAGG
G6PD(qPCR)	AGAAGGCTAGGTCTCCCGATG
ME (qPCR)	CCTTGCAGGACCGTAACGAGA
ME (qPCR)	CCTGGAGCGACGATAAATGGA
IDH(qPCR)	CTCGTCCCTGGGTGGACAG
IDH(qPCR)	CCATCAGCGGGCGTAAAA
18S rDNA	CGTACTACCGATTGAATGGCTTAG
18S rDNA	CCTACGGAAACCTTGTTACGACT

注：下划线为限制性酶切位点

1.3.3 根癌土壤杆菌介导转化高山被孢霉 CCFM501

采用现有的 ATMT 法介导转化高山被孢霉 CCFM501[16]，具体步骤如下：

用挑菌环将已导入质粒 pBIG2-ura5s-*MTHFD1* 的根癌土壤杆菌 CCFM 834 在添加了抗生素 100 μg/mL 利福平和 100 μg/mL 卡那霉素的 YEP 固体培养基上划线，倒置放在 30℃恒温箱中避光培养 1-2 天，从而得到单菌落。挑取单克隆接

种至液体 20 mL YEP 培养基中，并添加 100 μg/mL Rif 和 Kana，置于 30℃摇床中，200 r/min 避光培养 1-2 天。再吸取 200 μL 转接到 MM 液体培养基中，30℃，200 r/min 避光培养 1-2 天后，转接到 20 mL IM 液体培养基中，调整菌体浓度至 OD600 为 0.3 左右。将其置于 30℃摇床中，200 r/min 避光培养至 OD_{600} 为 0.8 左右。取在 GY-U 斜面上培养超过 1 个月的尿嘧啶营养缺陷性高山被孢霉 CCFM 501，用 4-5 mL Broth-U 培养基冲刷斜面，用血球计数器对收集的孢子液进行计数，调整孢子浓度到 10^5 个/μL。取根癌土壤杆菌和孢子液等比例混合后，使用涂布棒将混合液均匀涂布在表面铺有灭菌玻璃纸的 IM 固体培养基上。正置放在 16℃恒温箱中避光培养 2 天再正置放于 23℃避光培养 1 天后，使用无菌镊子将玻璃纸转移到 SC-CS 平板上。正置于 16℃恒温箱中培养 2 天后再正置于 23℃培养。持续观察 SC-CS 平板上菌落的生长情况，及时用尖头镊子将新长出来的菌落外沿挖出，接种于新 SC-CS 平板上，置于 23℃培养箱中培养，重复筛选 3 次。将稳定遗传的菌株摇瓶培养后，按照试剂盒 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit 说明书上的提取步骤提取重组高山被孢霉菌株 MA-MTHFD1 的基因组 DNA，用一对与启动子和终止子特异性结合的引物 HisproF1 和 TrpCR1（表 2）进行 PCR 验证。

1.3.4 高山被孢霉脂肪酸提取及检测

参考 Bligh [17]等人的方法，利用 GC-MS 对脂肪酸组分进行分析。

1.3.5 高山被孢霉 NADPH 提取与检测

根据 NADP/NADPH QuantificationColorimetric Kit 试剂盒说明书，提取高山被孢霉中的 NADPH。使用分析天平称取 0.1 g 左右高山被孢霉样品于研钵中，边加入液氮边进行充分研磨，然后加入 1 mL 提取缓冲液（NADP/NADPH Extraction buffer）继续研磨至融化，转移液体至 2 mL 离心管中，12000 g 离心 10 min 后转移上清至 1.5 mL EP 管中，之后依据说明书完成剩下的提取步骤。

1.3.6 基因转录水平的 RT-qPC 检测

根据 PrimeScript RT reagent kit 试剂盒说明书对重组菌株总 RNA 进行反转录得到 cDNA 模板。使用 CFX96 Real-Time PCR System，按照 iTaq Universal SYBR Green Supermix 说明书，使用荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR 反应[18]。反应体系见表 3。PCR 程序为：95°C 2 min，55°C 10s，共计 40 个循环。18S rDNA 作为管家基因。利用 2-(ΔΔCt)计算基因转录水平倍数变化，其中ΔΔCt 为ΔCt (样品)-ΔCt (参照)。引物序列见表 2。

表 3 荧光定量 PCR 体系（20 μL）

Table 3 Real-Time PCR System

成分	取量
Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 μL
cDNA	1 μL
上下游引物	各 1 μL
无酶水	7 μL

2 结果与分析

2.1 过表达载体构建

根据 *MTHFD1* 基因序列设计引物(表 2),通过 PCR 扩增得到目的条带(1200

bp，图 2）。将纯化后的 PCR 产物连接至载体 pBIG2-ura5s-ITs 上，命名为 pBIG2-ura5s-*MTHFD1*（图 3），对转化子进行 PCR 鉴定，两条产物条带分别为 ura5（818 bp）和 MTHFD1（*MTHFD1* 1200 bp 加载体上 164 bp 共 1364 bp）两个表达单元（图 2）。测序成功后，再将载体 pBIG2-ura5s-*MTHFD1* 电击转入根癌土壤杆菌 CCFM 834。

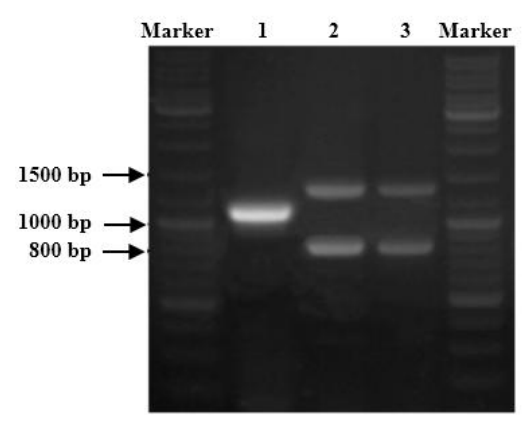


图 2 *MTHFD1* 基因的 PCR 产物（1），重组质粒 pBIG2-ura5s-*MTHFD1* 的 PCR 鉴定（2）及高山被孢霉重组菌株 *MA-MTHFD1* 基因组的 PCR 鉴定（3）

Fig.2 PCR cloning products of *MTHFD1*（1），PCR identification of recombinant plasmid pBIG2-ura5s-*MTHFD1*（2）and PCR identification of recombinant strain *MA-MTHFD1*（3）

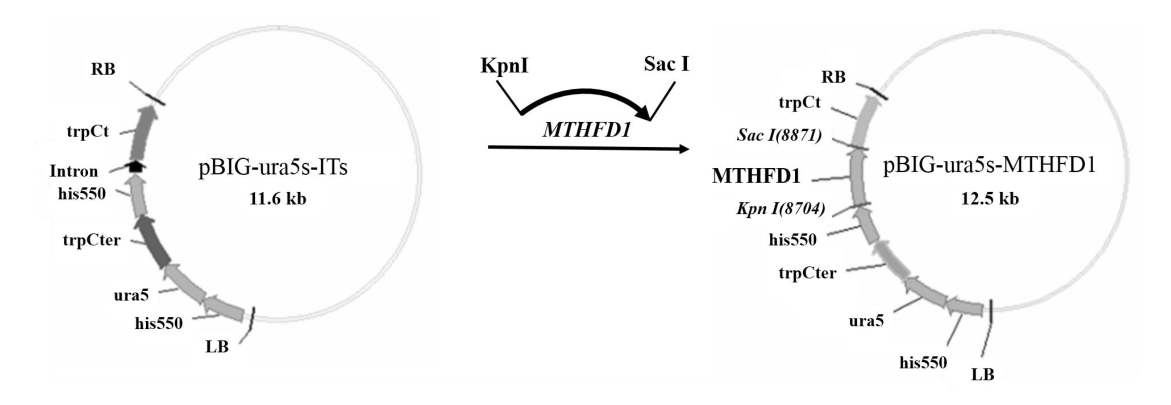


图 3 二元表达载体 pBIG2-ura5s-*MTHFD1* 的构建图示

Fig.3 Schemas of the construction of recombinant plasmid pBIG2-ura5s-*MTHFD1*

2.2 过表达重组菌株筛选与鉴定

采用 ATMT 法将含有二元表达载体的根癌土壤杆菌 CCFM 834 转化进高山被孢霉 CCFM 501 中，在筛选培养基 SC-CS 平板上筛选出稳定遗传的过表达菌株 *MA-MTHFD1*，并将其保藏于 GY 斜面上。提取 *MA-MTHFD1* 菌株的基因组 DNA，用一对与启动子和终止子特异性结合的引物 HisproF1 和 TrpCR1 来进行 PCR 验证（表 2），电泳结果显示两条条带分别为 ura5（818 bp）和 MTHFD1（1364 bp）两个表达单元（图 3），这表明二元表达载体成功整合到高山被孢霉基因组中。qPCR 分析结果显示（图 4），与原养型高山被孢霉相比，*MA-MTHFD1* 菌株中 *MTHFD1* 基因转录水平提高了 88.98%，说明转化的 *MTHFD1* 基因表达原件成功实现了转录，*MA-MTHFD1* 菌株构建成功。

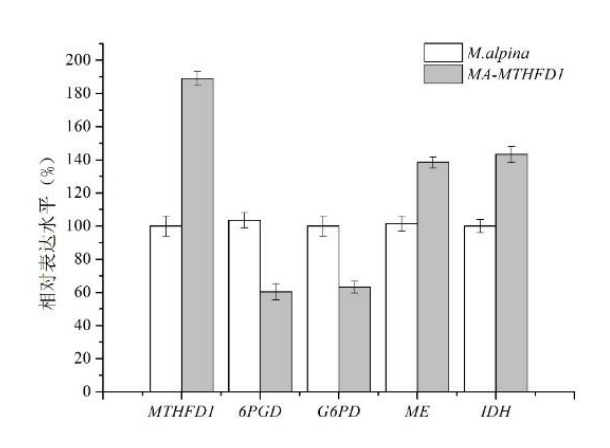


图 4 过表达 *MTHFD1* 对产 NADPH 相关基因转录水平的影响

Fig.4 Effects of *MTHFD1* overexpression on transcript levels of NADPH-generating genes

2.3 过表达重组菌株菌体干重分析

MA-MTHFD1 菌株和原养型菌株在 Broth 发酵培养基中培养 7 天后，收集菌体冷冻干燥后测量两者的干重（图 5）。原养型高山被孢霉和 *MA-MTHFD1* 菌株的菌体干重分别为 8.54 g/L 和 8.89 g/L，两者间没有显著变化，说明过表达 *MTHFD1* 基因不会影响高山被孢霉菌体干重。在培养过程中，*MA-MTHFD1* 菌株与原养型菌株生长状态保持一致，也进一步说明过表达 *MTHFD1* 基因不会影响高山被孢霉的生长。

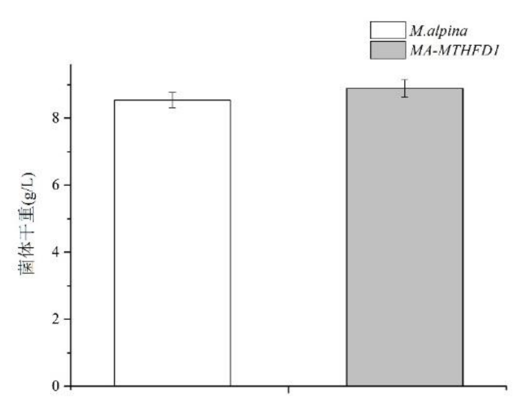


图 5 过表达 *MTHFD1* 对生物量的影响

Fig.5 Effects of *MTHFD1* overexpression on dry cell weight

2.4 过表达重组菌株中脂肪酸含量分析

按照 1.3.4 方法对过表达重组菌株和原养型菌株进行脂肪酸含量测定（表 4 和图 6），从而确定 *MTHFD1* 基因和高山被孢霉脂质合成之间的关系。与原养型高山被孢霉相比，*MA-MTHFD1* 菌株中总脂肪酸含量增加了 40.13%（图 6），这表明过表达 *MTHFD1* 基因后，增加了高山被孢霉总脂肪酸的含量。进一步分析 *MA-MTHFD1* 菌株和原养型菌株内脂肪酸的相对组成后，发现 *MA-MTHFD1* 菌株中花生四烯酸含量增高了 91.12%。这表明过表达 *MTHFD1* 基因后，增加了脂肪酸的不饱和度。

表 4 高山被孢霉脂肪酸含量

Table 4 The content of fatty acids in *M. alpina*

菌株	脂肪酸组成（mg/mg，菌体干重）							脂肪酸总量（mg/mg 菌体干重)
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:3	C20:4	
M. alpina	0.178±0.027	0.116±0.008	0.305±0.008	0.063±0.004	0.036±0.001	0.037±0.004	0.228±0.024	0.350±0.034
MA-MTHFD1	0.128±0.002	0.137±0.006	0.100±0.035	0.081±0.003	0.048±0.002	0.039±0.005	0.435±0.050	0.491±0.006

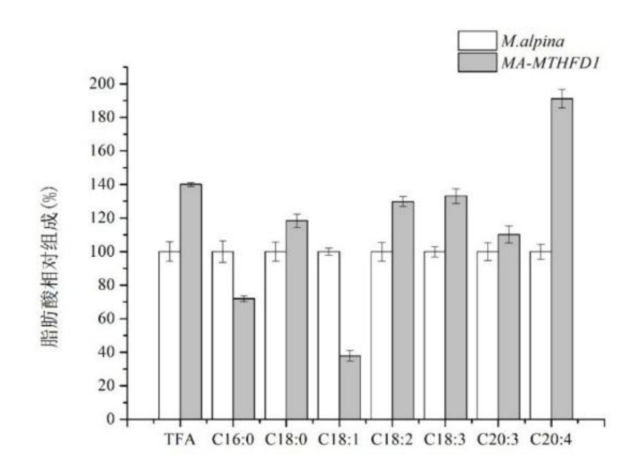


图 6 过表达 *MTHFD1* 对脂肪酸相对组成的影响

Fig.6 Effects of *MTHFD1* overexpression on relative composition of fatty acids

2.5 过表达重组菌株中 NADPH 含量分析

过表达 *MTHFD1* 基因后，*MA-MTHFD1* 菌株中还原力 NADPH 的含量从 0.0379 mg/g 增加到 0.0479 mg/g（图 7），即增加了 26.38%。这表明过表达 *MTHFD1* 基因后，提高了高山被孢霉 NADPH 的合成能力。

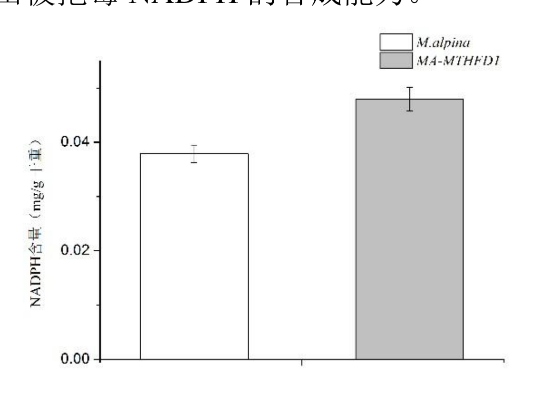


图 7 过表达 *MTHFD1* 对 NADPH 含量的影响

Fig.7 Effects of *MTHFD1* overexpression on NADPH content

2.6 过表达重组菌株中 NADPH 合成相关基因的转录水平分析

为探究过表达 *MTHFD1* 基因对高山被孢霉脂肪合成途径的影响，通过 RT-qPCR 分析脂质合成途径中产 NADPH 相关基因的转录水平。由图 4 可以看出，在 NADPH 合成途径中，与原养型高山被孢霉相比，尽管 *6PGD* 和 *G6PD* 的转录

水平分别下调了39.66%和36.89%，但*ME*和*IDH*的转录水平分别上调了38.44%和43.25%。这表明*MTHFD1*在脂质合成所需还原力NADPH合成调控中起重要作用。

3 结论

综上所述，为了研究过表达*MTHFD1*基因与高山被孢霉脂质合成之间存在的联系，本文构建了*MTHFD1*过表达载体，成功筛选出过表达重组菌株*MA-MTHFD1*。结果表明，*MTHFD1*基因在高山被孢霉脂质合成中具有重要作用。与原养型高山被孢霉相比，*MA-MTHFD1*菌株的总脂肪酸含量、脂肪酸不饱和度以及NADPH的含量显著提高。此外，过表达*MTHFD1*基因在提高*MTHFD1*基因转录水平的同时，也上调了NADPH合成途径中ME和IDH的转录水平，增强了脂质合成所需还原力NADPH的来源。

参考文献

[1] Wang H, Yang B, Hao G, et al. Biochemical characterization of the tetrahydrobiopterin synthesis pathway in the oleaginous fungus Mortierella alpina. Microbiology-Sgm. 2011.157:3059-70.

[2] Nisha A, Venkateswaran G. Effect of Culture Variables on Mycelial Arachidonic acid Production by Mortierella alpina. Food and Bioprocess Technology. 2011.4(2):232-40.

[3] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochimie. 2004.86(11):807-15.

[4] Maehre HK, Jensen IJ, Elvevoll EO, et al. omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. International Journal of Molecular Sciences. 2015.16(9):22636-61.

[5] Sakuradani E, Abe T, Iguchi K, et al. A novel fungal omega3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing Mortierella alpina 1S-4. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(6):648-654. 230

[6] Sakuradani E, Kobayashi M, Ashikari T, et al. Identification of Delta12-fatty acid desaturase 225 from arachidonic acid-producing mortierella fungus by heterologous expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae and the fungus Aspergillus oryzae. European Journal of Biochemistry, 1999, 261(3):812-820.

[7] Kaufman S. New Tetrahydrobiopterin-Dependent Systems. Annual Review of Nutrition. 1993.13:261-86.

[8] Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. Nature. 2014.510(7504):298-302.

[9] Lewis CA, Parker SJ, Fiske BP, et al. Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells. Molecular Cell. 2014.55(2):253-63.

[10] Ratledge C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. Biotechnology Letters. 2014.36(8):1557-68.

[11] Wang L, Chen W, Feng Y, et al. Genome Characterization of the Oleaginous Fungus Mortierella alpina. Plos One. 2011.6(12).

[12] Pawelek PD, MacKenzie RE. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase from Photobacterium phosphoreum shares properties with a mammalian mitochondrial homologue. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology. 1996.1296(1):47-54.

[13] Patel H, Christensen KE, Mejia N, et al. Mammalian mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase derived from a trifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase-synthetase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2002.403(1):145-8.
[14] Bolusani S, Young BA, Cole NA, et al. Mammalian MTHFD2L Encodes a Mitochondrial Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase Isozyme Expressed in Adult Tissues. Journal of Biological Chemistry. 2011.286(7):5166-74.
[15] 王鸿超, 刘媛, 顾震南, 等. 叶酸代谢抑制剂对小鼠骨髓基质细胞增殖和分化的影响. 食品科学. 2016(15):215-20.
Wang H C, Liu Y, Gu Z N, et al. Effect of folate metabolism inhibitor on proliferation and differentiation of mouse marrow stromal cells. Food Science. 2016(15):215-20.
[16] Chen H, Hao G, Wang L, et al. Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi. Scientific Reports. 2015.5.
[17] Bligh E G , Dyer W J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Canadian Journal of Biochemistry & Physiology, 1959, 37(8):911-917.
[18] Wang H, Chen H, Hao G, et al. Role of the Phenylalanine-Hydroxylating System in Aromatic Substance Degradation and Lipid Metabolism in the Oleaginous Fungus Mortierella alpina. Applied and Environmental Microbiology. 2013.79(10):3225-33.